

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K19507
研究課題名（和文）細菌感染に対して有効な宿主免疫賦活化薬剤の創出

研究課題名（英文）Development of anti-inflammatory drug

研究代表者

Kim Minsoo (KIM, MINSOO)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：50466835

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：既存の抗生剤には多剤耐性菌の出現・蔓延と、腸内細菌叢の破壊といった重大な問題がある一方、これらを克服する新規感染症治療薬が希求されているものの、2010年代以降新薬は殆ど上市されていない。

本研究では、既存抗生剤や低分子治療薬の作用機序とは異なり、病原細菌の病原性惹起に必要な特異的メカニズムを狙った、全く新規のコンセプトから成る感染症治療方法の創出に挑戦した。具体的には、細菌感染時に誘導される「マクロファージの細胞死を抑制する化合物を開発するために化合物スクリーニングを行い、中分子感染症治療薬としての新規メカニズムに成り得るか」を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中分子感染症治療薬は、標的への特異性が低いため副作用が起こりやすく、多剤耐性が生まれやすい既存の低分子の弱点を補う新しいモダリティである。本研究で開発された新しい治療戦略は、特異性が高く、副作用が少ないと考えられるので、本剤の成果は慢性細菌感染症や多剤耐性菌・ウイルスによる感染症などへの展開できる考えられる。

薬剤耐性菌による感染症は、生命を脅かす危険性があり、アンメット・メディカル・ニーズは極めて高い。本研究で開発される新しい概念の感染症治療薬は、新興・再興感染症に対するグローバルな感染症対策に対して更なる貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：While existing antibiotics have serious problems such as the emergence and spread of multidrug-resistant bacteria and the destruction of the intestinal microflora, new drugs for infectious diseases have been sought to overcome these problems, but few new drugs have been launched since the 2010s.

In this study, we aimed to develop a method for infectious diseases based on a completely new concept, which is different from the mechanism of action of existing antibiotics and small molecule therapeutics and targets the specific mechanism required to induce virulence in pathogenic bacteria. We conducted a compound screening to develop a compound that inhibits macrophage cell death, which is induced during bacterial infection, and examined whether it could be a novel mechanism as a therapeutic agent for infectious diseases.

研究分野：感染生物学

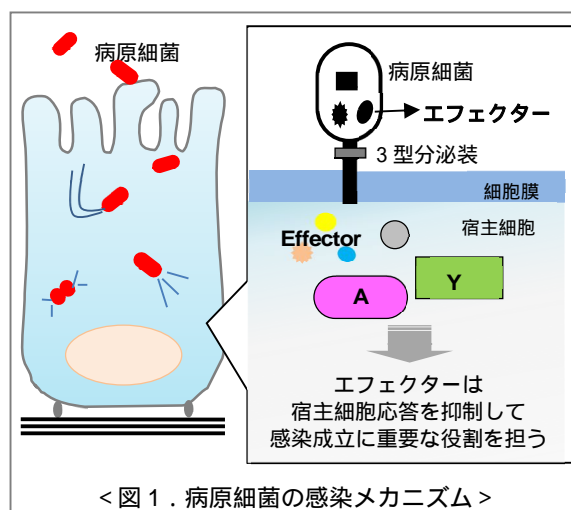
キーワード：病原細菌 免疫

1. 研究開始当初の背景

病原細菌による感染症は近年、多剤耐性菌による感染症例が増加し、有効なワクチンもいまだ開発されていないものも多く、新たな治療薬の開発が望まれている(参考文献)。抗生剤の開発で、これら病原細菌による感染症の治療を行っているが、抗生剤による副作用が重大な問題になっている(参考文献)。既存の抗生剤は、細菌細胞壁の合成、転写反応に対する阻害剤など、病原細菌にも常在菌にも効き、細菌全般を殺傷する結果、腸内細菌叢を破壊する薬剤が多い。そのため、(1) 既存抗生剤とは作用機序が異なり、多剤耐性菌にも効く、(2) 病原細菌のみに効果があり、常在菌や宿主(ヒト)には作用しない、全く新規の細菌感染治療薬の創出がアンメット・メディカル・ニーズとして待望されている。さらに、低分子阻害剤は創薬の標的となる蛋白質の活性阻害剤が多く、druggable なものは限られている。さらに阻害剤は大量に投与しなくては効果が出ないため、Off target エフェクトや毒性などが問題である。アンメット・メディカル・ニーズに答えられる新しい創薬モダリティの開発が期待されている。

2. 研究の目的

宿主側は炎症反応など、病原体に対する生体防御システムを持つが、腸管病原細菌はその防御システムを無効化するために、III型分泌装置と呼ばれる注入装置により病原因子(=エフェクター)を宿主細胞に分泌する(図1)。これらのエフェクターは宿主のシグナル伝達系や感染免疫反応を巧妙に制御し、宿主の生体防御機構を無効化して、感染を成立・拡大する(参考文献)。本研究では、既存の抗生剤や低分子創薬の問題点の克服を目指し、自然免疫活性化を狙った新しい感染症治療方法の創出を目的とする。



3. 研究の方法

(1) 化合物スクリーニング

Differential scanning fluorimetry(DSF)は、蛋白質溶液に蛍光色素を加え、昇温すると蛋白質がアンフォールディングし、内側に存在する疎水性領域が露出させる。その際、蛍光色素が蛋白質の疎水性領域と相互作用をする。その作用を利用して蛍光を検出することで蛋白質のアンフォールディングの際の温度 T_m を検出する。この方法は化合物との相互作用解析に利用される。エフェクター(Y)と結合する化合物を調べるために、DSF法を使用した。京都大学医学支援センターが持つ化合物ライブラリー(2438化合物)をスクリーニングに用いた。白色96ウェルPCRプレート(Bio-Rad社)を用い、化合物5 μ L + 標的蛋白質10 μ L + 蛍光色素5 μ Lを混合した。蛍光色素としてPROTEOSTAT(Enzo Life Science社)を用い、リアルタイムPCR検出システムCFX96(Bio-Rad社)を用いて25~80の範囲で蛍光をモニターした。融解温度(T_m)はCFX Maestroソフトウェア(Bio-Rad社)により算出した。ネガティブコントロール(NC)として、タンパク + 蛍光色素を用

いた。融解温度の変化 (ΔT_m) は、化合物存在下での T_m から化合物なしの標的タンパク質の T_m の平均を引くことによって計算した。 ΔT_m が ± 0.6 変動したものをヒット化合物とした。

(2) 結合親和性 (分子間相互作用) 解析

化合物との親和性を測定する方法として、Microscale Thermophoresis (MST)法を用いた。HIS-タグをエフェクター (Y) に融合した蛋白質を精製し、蛍光標識ラベルをし、MST (Nano Temper社) 解析に用いた。ターゲット蛋白質に化合物が結合すると、蛍光スペクトルが変化することを利用して、化合物と蛋白質の結合定数 (KD) を算出した。

(3) 二量体形成能測定

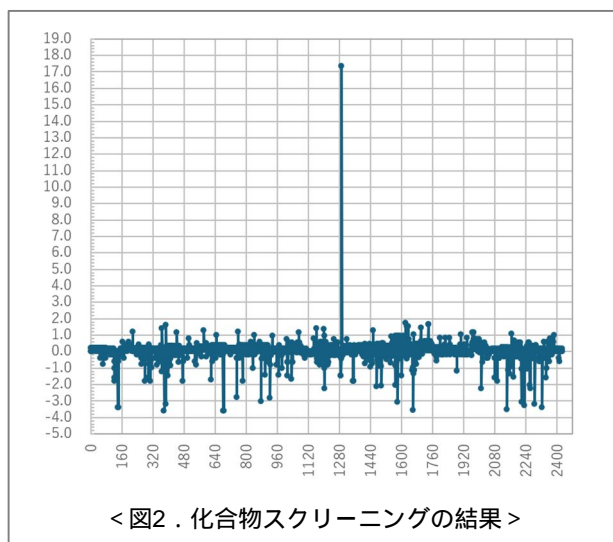
iDimerize Inducible Homodimer System (TAKARA社) は、低分子化合物の添加によりタンパク質間相互作用をリアルタイムで測定できるシステムである。エフェクター (Y) を DmrB 結合ドメインと融合し、293T 細胞に発現させ、B/B Homodimerizer (AP20187リガンド) を培地へ添加することにより、標的蛋白質のダイマー形成能を免疫染色により調べた。さらに、蛋白質の相互作用を測定する NanoBRET システム (Promega社) を利用して、タイマー形成を調べた。NanoBRET システムは NanoLucルシフェラーゼをエネルギー転移ドナー、HaloTag NanoBRET 618 fluorescent Ligand で標識された HaloTag タンパク質をエネルギー転移アクセプターとして利用する BRET (生物発光共鳴エネルギー転移) ベースのアッセイで、生細胞内で2つのタンパク質の相互作用を測定に利用される。NanoLuc または、HaloTag とエフェクター (Y) を融合し、293T 細胞に発現させ、Ligand を加え、ダイマー形成能をマルチプレートリーダー (ARVO, PerkinElmer社) 測定した。

4. 研究成果

自然免疫の活性化に関わるエフェクター (Y) をターゲットとし、エフェクター (Y) に結合する化合物を同定し、エフェクター (Y) の機能阻害剤の開発を行った。

(1) エフェクター (Y) と結合する化合物の同定

エフェクター (Y) 蛋白質を大腸菌から精製し、エフェクター (Y) と化合物との相互作用を検出する系 (DSF法) を確立した。確立したスクリーニング法を用いて、京都大学・医学支援センターの化合物ライブラリー (2438化合物) に対して、ハイスルプットスクリーニングを行った。その結果、230種類のヒット化合物を得た (図2)。スクリーニングで得られたヒット化合物の選択性・特異性を調べるために、他のエフェクター蛋白質やコントロール蛋白質を用いて、同様な実験を行い、相互作用を調べた。その結果、エフェクター (Y) に特異的に結合する候補化合物 (X) を得ることができた。



(2) ヒット化合物の検証

候補化合物 (X) とエフェクター (Y) との結合力を調べることは、創薬の展開には必要不可欠であ

り、相互作用が強く、特異性が高い化合物が望ましい。両者の結合を調べるために、His-tag融合したエフェクター(Y)蛋白質を精製し、マイクロスケール熱泳動システム(MST)を使用し、両者の結合能(KD)を測定した。しかし、KDは非常に弱いものと考えた。

(3) エフェクター(Y)の機能解析

エフェクター(Y)のホモダイマーを形成することにより、細胞死が制御できるかを調べるために、細胞内でホモダイマーを形成する実験系の構築を行った。まず、iDimerize Inducible Homodimerを用いたタンパク質のホモダイマー化の誘導は、すでにin vitroおよびin vivoにおいて、シグナル伝達を制御するために広く使用されており、細胞増殖、細胞死など、タンパク質間相互作用により制御もしくは活性化されるさまざまな反応を誘導するために利用されている。この系を用いて、宿主細胞の細胞死の制御を調べた。エフェクター(Y)を発現する293Tに化合物(B/B Homodimerizer)を投与することにダイマー形成を誘導し、ダイマー形成能を見るために面積染色を行った。しかし、一過性発現システムでは、293Tの生存に影響があったため、HeLa細胞を用いて安定的発現株の作製を計画している。次に、NanoBretシステムを用いて、ダイマー形成能を測定した。その結果、化合物添加なしに比べて、化合物添加により細胞内でのダイマー形成能の上昇がみられた。この細胞を用いて、細胞死の制御を今後調べる。

(4) 考察

既存の抗生剤の問題に加え、低分子阻害剤の問題も多く、創薬の標的となるものは限られており、阻害剤は大量に投与しなくては効果が出ないため、Off target エフェクトや毒性などが挙げられる。申請者が挑戦する「中分子型エフェクターの機能阻害剤」は、感染細胞でのみ機能を果たす病原細菌由来の蛋白質のみをターゲットにするため、ヒトの蛋白質には作用せず特異性が高く、副作用が低いなどのメリットを有す、ことが挙げられる。

本研究では、『既存の抗生剤や低分子創薬の問題点の克服を目指して「中分子型エフェクター(Y)の機能阻害剤」の開発』に挑戦した。その結果、エフェクター(Y)に結合化合物は同定できたが、相互作用は弱く、化合物の合成展開をする必要があると考えられた。さらに、自然免疫に対するエフェクター(Y)の機能阻害能は今後作製した細胞を用いて測定する予定である。

病原細菌のエフェクター分子は、宿主の自然免疫応答の抑制や、獲得を制御することにより、感染を広げている。したがって、本研究成果は、エフェクターの機能を阻害することにより、宿主の免疫反応を賦活化につながると考えらえる。感染症治療薬は、多剤耐性菌の問題など、アンメット・メディカル・ニーズが高いとされている。本成果は、新しい感染症創薬モダリティとして、今後開発結果が期待される。

(5) 参考文献

Morens DM, et al. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*. 2004;430:242-249 DOI: 10.1038/nature02759.

Laxminarayan R, et al. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*. 2013;13:1057-1098 DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70318-9.

Kim M, et al. Bacterial effectors and their functions in the ubiquitin-proteasome system: insight from the modes of substrate recognition. *Cells*. 2014;3:848-864 DOI: 10.3390/cells3030848.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiragi Keito, Nishide Akira, Takagi Kenji, Iwai Kazuhiro, Kim Minsoo, Mizushima Tsunehiro	4. 巻 173
2. 論文標題 Structural insight into the recognition of the linear ubiquitin assembly complex by Shigella E3 ligase IpaH1.4/2.5	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 317 ~ 326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishide Akira, Takagi Kenji, Kim Minsoo, Mizushima Tsunehiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Active site structure of the Shigella flexneri effector OspI	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.02.15.480433	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 KIM Minsoo and Park SunJoo
2. 発表標題 Real-time, label-free monitoring of polyubiquitin chain formation with ubiquitin ligase
3. 学会等名 International conference Korean Society for Molecular and cell Biology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 武田美都里、伊藤寛朗、吉澤明彦、KIM Minsoo
2. 発表標題 乳がん患者の組織検体を用いた新規バイオマーカーの探索
3. 学会等名 第46回日本分生生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 腸管出血性大腸菌のNleLユビキチンリガーゼ阻害剤の探索
2. 発表標題 北畑圭亮、佐藤聡太、西出旭、佐藤裕介、長門石暁、津本浩平、KIM Minsoo
3. 学会等名 第46回日本分生生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西出 旭, 平木 慶人, 馬場 拓海, Muhammad Hasif Bin Abdul HALIM, KIM Minsoo, 水島 恒裕
2. 発表標題 Legionella steigerwaltii 脱アミド化酵素 CifLs 結晶構造解析
3. 学会等名 第46回日本分生生物学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------